

## IMMUNOASSAY AND ITS METHOD

**Patent number:** JP2001004628

**Publication date:** 2001-01-12

**Inventor:** KITAMORI TAKEHIKO; KIMURA HIROKO; TOKESHI  
MANABU; SATO NORIKAZU

**Applicant:** KANAGAWA KAGAKU GIJUTSU AKAD

**Classification:**

- international: *G01N33/483; G01N33/543; G01N33/544; G01N33/552;  
G01N33/483; G01N33/543; G01N33/544; G01N33/551;*  
(IPC1-7): G01N33/543; G01N33/483; G01N33/543;  
G01N33/544; G01N33/552

- european:

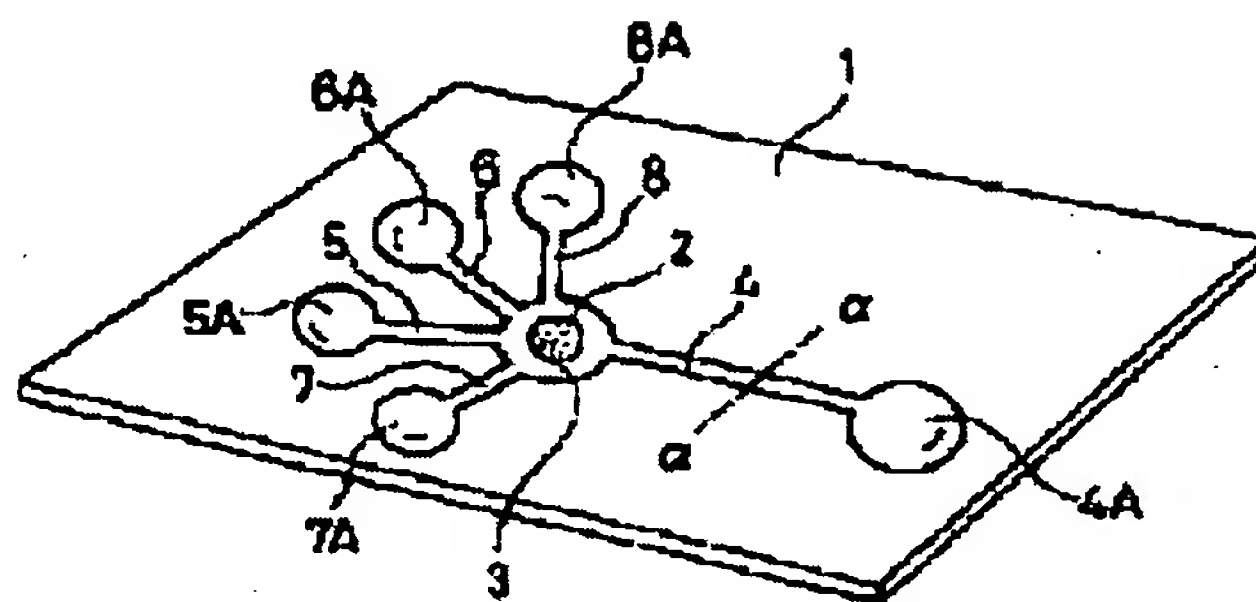
**Application number:** JP19990173041 19990618

**Priority number(s):** JP19990173041 19990618

**Report a data error here**

## Abstract of JP2001004628

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To easily, rapidly execute accurate immunoassay with a trace sample. **SOLUTION:** This immunoassay method uses an immunity analysis microchip. The microchip includes a solid fine particle 2 of a diameter below 1 mm as a reactive solid phase, a micro channel reaction bath part 3 having a larger cross section than the diameter of the solid fine particle 2, a micro channel separation part 4 having a smaller cross section than the diameter of the solid fine particle 2, and an inlet part or a micro channel inflow parts 5, 6 for separately leading an antigen and a labeled antibody to the reaction bath part 3.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-4628

(P2001-4628A)

(43)公開日 平成13年1月12日(2001.1.12)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト(参考)
G 0 1 N 33/543	5 2 1	G 0 1 N 33/543	2 G 0 4 5
	5 8 1		5 8 1
33/483		33/483	D
33/544		33/544	Z
33/552		33/552	
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 5 頁)			

(21)出願番号 特願平11-173041

(22)出願日 平成11年6月18日(1999.6.18)

特許法第30条第1項適用申請有り 1999年5月1日 社  
団法人日本分析化学会発行の「第60回分析化学討論会講  
演要旨集」に発表

(71)出願人 591243103

財団法人神奈川県科学技術アカデミー  
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号

(72)発明者 北森 武彦

千葉県松戸市松戸2172-1-308

(72)発明者 木村 博子

東京都渋谷区代々木1-44-9-403

(72)発明者 渡慶次 学

神奈川県川崎市多摩区宿河原4-30-8  
エルム宿河原401

(74)代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

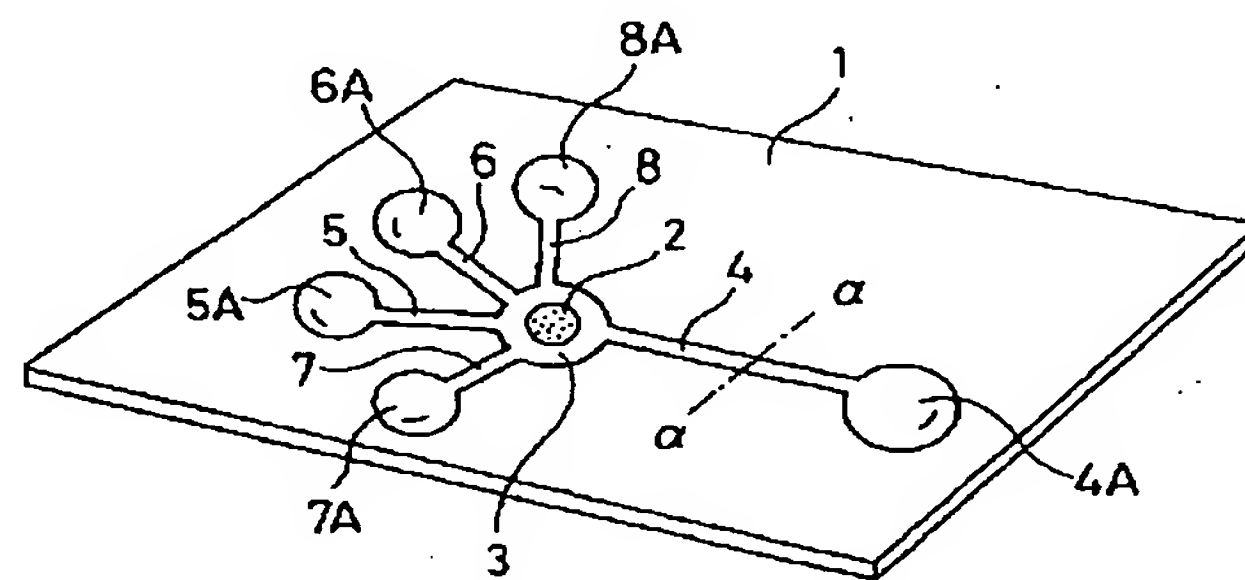
(54)【発明の名称】 免疫分析装置と免疫分析方法

(57)【要約】

【課題】 微量試料で、簡便に短時間で、高精度な免疫  
分析を可能とする。

【解決手段】 反応固相としての直径1mm以下の固体  
微粒子(2)とともに、この固体微粒子(2)の径より  
も大きい断面積を有するマイクロチャンネル反応槽部  
(3)と、前記固体微粒子(2)の径よりも小さい断面  
積を有するマイクロチャンネル分離部(4)とを備え、  
抗原および標識抗体を別々に前記反応槽部(3)へと導  
く導入部もしくはマイクロチャンネル流入部(5)

(6)を有している免疫分析マイクロチップを構成し、  
これを用いて分析する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 反応固相としての直径 1 mm 以下の固体微粒子とともに、この固体微粒子の径よりも大きい縦断面積を有するマイクロチャンネル反応槽部と、前記固体微粒子の径よりも小さい縦断面積を有するマイクロチャンネル分離部と、抗原および標識抗体を別々に前記反応槽部へと導く導入部もしくはマイクロチャンネル流入部とを有しているマイクロチップとを備えていることを特徴とする免疫分析装置。

【請求項 2】 標識抗体とは別の抗体のためのマイクロチャンネル流入部を有している請求項 1 の免疫分析装置。

【請求項 3】 固体微粒子はガラスビーズもしくは高分子ビーズである請求項 1 または 2 の免疫分析装置。

【請求項 4】 請求項 1 ないし 3 のいずれかの装置による免疫分析方法であって、反応固相としての固体微粒子をマイクロチャンネル反応槽部に装入し、マイクロチャンネル流入部より導入した抗原および標識抗体の固体微粒子上で反応を行い、未反応物をマイクロチャンネル分離部で分離し、光熱変換分析により分析することを特徴とするマイクロチップ免疫分析方法。

【請求項 5】 第一抗体とともに、第二抗体としての標識抗体を反応槽部へと導く請求項 4 の分析方法。

【請求項 6】 標識抗体を金コロイド標識抗体とする請求項 4 または 5 の分析方法。

【請求項 7】 光熱変換分析が 2  $\mu$  m 以下の高空間分解能の熱レンズ顕微鏡、蛍光分析、あるいは化学発光による分析である請求項 4 ないし 6 のいずれかの分析方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 この出願の発明は、免疫分析装置とこれを用いた分析方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術とその課題】 従来より、各種の抗原-抗体反応による免疫分析法が知られており、この分析のための簡便化手段としての分析キット類についての検討が進められてきている。しかしながら、従来一般的な方法においては、免疫分析には複雑な工程と数日間にわたる時間が必要とされる等の問題があり、また、多くの場合には、蛍光色素による標識が必要とされていることから、この蛍光色素標識による試料ダメージの発生が避けられない等の問題もあった。

【0003】 このため、従来より、生体高分子等の免疫分析法については、反応・分離検出を簡便な手段によって短時間で高精度で行うことができ、しかも試料にダメージを与えることもない分析方法の実現が望まれていた。このような状況において、ガラス等の基板（以下マイクロチップと呼ぶ）上に化学システムを集積化する試みは操作の簡便化・自動化による分析時間の短縮などのメリットをもたならずと期待され、 $\mu$ -TAS と称され

近年盛んに行われてきている。この出願の発明者も、熱レンズ顕微鏡による超微量分析や微小空間のサイズ効果として迅速分子輸送に分子拡散力が有効なことなどに注目し、独自の集積化の研究を進めているところである。しかしながら、免疫分析については、DNA 解析と同様に電気浸透・電気泳動を利用した  $\mu$ -TAS の重要な対象として期待され、高度な構造を持つ様々な形状のチップが開発されてきているが、これまでのところ、実際にマイクロチップ内で抗原-抗体反応をさせた例はほとんど報告されていないのが実情である。

【0004】 そこでこの出願の発明は、以上のとおりの従来技術の限界を超えて、実際にマイクロチップ内における抗原-抗体反応を可能として免疫分析を実施することのできる新しい免疫分析装置と、これを用いた分析方法を提供することを課題としている。そして、この出願の発明は、このような新しい分析装置と新しい分析方法によって、反応・分離検出を簡便な手段によって短時間で高精度で行い、しかも試料にダメージを与えることもないようにする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第 1 には、反応固相としての直径 1 mm 以下の固体微粒子とともに、この固体微粒子の径よりも大きい縦断面積を有するマイクロチャンネル反応槽部と、前記固体微粒子の径よりも小さい縦断面積を有するマイクロチャンネル分離部と、抗原および標識抗体を別々に前記反応槽部へと導く導入部もしくはマイクロチャンネル流入部とを有しているマイクロチップとを備えていることを特徴とする免疫分析装置を提供する。

【0006】 また、第 2 には、標識抗体とは別の抗体のためのマイクロチャンネル流入部を有している免疫分析装置を、第 3 には、固体微粒子はガラスビーズもしくは高分子ビーズである請求項 1 または 2 の免疫分析装置を提供する。そして、この出願の発明は、第 4 には、前記第 1 ないし第 3 のいずれかのマイクロチップによる免疫分析方法であって、反応固相としての固体微粒子をマイクロチャンネル反応槽部に装入し、マイクロチャンネル流入部より導入した抗原および標識抗体の固体微粒子上で反応を行い、未反応物をマイクロチャンネル分離部で分離し、光熱変換分析により分析することを特徴とするマイクロチップ免疫分析方法を提供し、第 5 には、第一抗体とともに、第二抗体としての標識抗体を反応槽部へと導く方法を、第 6 には、標識抗体を金コロイド標識抗体とする方法を、第 7 には、光熱変換分析が 2  $\mu$  m 以下の高空間分解能の熱レンズ顕微鏡、蛍光分析あるいは化学発光による分析である分析方法も提供する。

## 【0007】

【発明の実施の形態】 この出願の発明は、上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態につ



いて説明する。まず、この発明の免疫分析装置であるが、その構成はたとえば図1に沿って例示説明することができる。

【0008】たとえば図1に示したように、ガラス、シリコン等の基板、より好ましくは透明なガラス等の基板(1)において、この発明の免疫分析マイクロチップの場合には、反応固相としての直径1mm以下の固体微粒子(2)とともに、この固体微粒子(2)の径よりも大きい縦断面積を有するマイクロチャンネル反応槽部

(3)と、前記固体微粒子(2)の径よりも小さい縦断面積を有するマイクロチャンネル分離部(4)とを備え、抗原および標識抗体を別々に前記反応槽部へと導く導入部もしくはマイクロチャンネル流入部(5)(6)を有している。

【0009】また、図1の例においては、第二抗体としての標識抗体の反応槽部(3)への導入のためのマイクロチャンネル流入部(6)とともに、第一抗体の導入のためのマイクロチャンネル流入部(7)、並びにバッファ液や洗浄液の導入のためのマイクロチャンネル流入部(8)を備えており、各々のマイクロチャンネル流入部(5)(6)(7)(8)の端部には、抗原、標識抗体(第二抗体)、第一抗体、そして洗浄液の注入穴部(5A)(6A)(7A)(8A)が設けられてもいる。

【0010】そして、図1の例では、マイクロチャンネル分離部(4)の端部には、廃液部(4A)が設けられている。固体微粒子(2)は、免疫抗原-抗体反応のための反応固相としての役割を果たすものであって、たとえばガラスビーズ、あるいはポリスチレン等の高分子ビーズ等が用いられることになる。この固体微粒子(2)は、この発明のマイクロチップにおいては、直径が1mm以下、たとえば15~85 $\mu$ m、さらには直径40~65 $\mu$ mのものとして用いられる。

【0011】マイクロチャンネル反応槽部(3)の大きさは、その縦断面積、より具体的には、半球状、あるいは湾曲状の穴部である場合、垂直方向の最大断面積が前記の固体微粒子(2)の直径よりも大きく、一方、マイクロチャンネル分離部(4)の流路断面積、つまり図1の $\alpha-\alpha$ 位置での断面積が固体微粒子(2)の直径よりも小さいことがこの発明においては要件となっている。

【0012】たとえば、より具体的には、マイクロチャンネル反応槽部(3)の大きさは、半球状の穴部とした場合には、たとえばその半径が100 $\mu$ m以上、より好ましくは150 $\mu$ m以上とすることが考慮される。また、マイクロチャンネル分離部(4)はたとえば、深さが10 $\mu$ m以下、幅10 $\mu$ m以下とすることが考慮される。このようにすることによって、反応固相としての固体微粒子(2)は、マイクロチャンネル分離部(4)に流入することではなく、せき止められることになる。そして未反応物だけが、マイクロチャンネル分離部(4)に

流入して分離されていることになる。また、必要に応じて、固体微粒子(2)から脱着された反応生成物のみが分離されることになる。

【0013】抗原の導入のためのマイクロチャンネル流入部(5)は必ずしも図1のようである必要はなく、直接的に抗原を反応槽部(3)に導入するようにしてもよいし、あるいは、あらかじめ抗原を吸着させた状態の固体微粒子(2)をマイクロチャンネル反応槽部に導入するようにしてもよい。マイクロチャンネル流入部(5)(6)(7)(8)については、たとえば、深さを150 $\mu$ m以下、幅を300 $\mu$ m以下程度のものとして構成することができる。抗原や抗体がマイクロチャンネル反応槽部(3)に流入できる大きさの断面積をもつものとすればよい。

【0014】この発明の免疫分析マイクロチップは、基板(1)の表面に対して以上の構成を形成したものとしてもよいし、あるいは、多層構造として、たとえば図2に、図1の $\alpha-\alpha$ 部の断面を例示したように、マイクロチャンネル分離部4等の形成した基板(1)の表面に保護プレート(11)を、また、さらに必要に応じて裏面に補強のための支持プレート(12)を積層した構造としてもよい。この図2のような積層体の構造の場合には、保護プレート(11)には、前記の反応槽部(3)、注入穴部(5A)(6A)(7A)(8A)、廃液部(4A)の相当位置に開口が設けられているものとする。

【0015】いずれの場合においてもこの発明の免疫分析マイクロチップによって、微量の試料等の使用によって、簡便に短い反応時間で免疫分析が可能となる。免疫分析の方法としては、この発明においては、反応固相としての固体微粒子(2)をマイクロチャンネル反応槽部(3)に導入し、導入部もしくはマイクロチャンネル流入部(5)(6)より導入した抗原および標識抗体、さらに必要によりマイクロチャンネル流入部(7)より導入した抗体の固体微粒子(2)上での反応を行い、未反応物をマイクロチャンネル分離部(4)で分離し、光熱変換分析により分析することを可能としている。

【0016】標識抗体としては、代表的には、金コロイド標識抗体が適当なものとして例示される。反応物は、固体微粒子(2)上に吸着され、未反応物のみがマイクロチャンネル分離部(4)にて分離されるか、反応生成物は固体微粒子(2)より脱着されてマイクロチャンネル分離部(4)にて分離されることになる。

【0017】光熱変換分析については、たとえばその代表例としてはこの出願の発明者らがすでに提案している熱レンズ顕微鏡による分析がある。より好ましくは、2 $\mu$ m以下の高空間分解能の熱レンズ顕微鏡による分析である。この分析は、反応生成物が吸着されている固体微粒子(2)に対して行われもよいし、マイクロチャンネル分離部(4)に対して行われるようにしてもよい。また、熱レンズ顕微鏡による分析だけでなく蛍光分析でも

よいし、化学発光分析等が採用されてもよい。

【0018】以上のとおりのこの出願の発明によって、反応・分離検出を簡便に、短時間で、しかも高精度で行うことができ、しかも従来の方法のように、試料に対してダメージを与えることもない。そこで以下に実施例を示し、さらに詳しくこの出願の発明について説明する。

#### 【0019】

【実施例】（実施例1）モデル試料として局所免疫やストレス関連物質として知られる s l g A を選定し、B/F 分離操作などの集積化について検討した。すなわち、ヒト s l g A を吸着させた直径 43～60 μm のガラス微粒子やポリスチレン微粒子をそれぞれマイクロチャンネル反応槽部に導入して堰き止め、反応固相とした。次に金コロイド標識抗抗体をマイクロチャンネル流入部を通じて反応槽部に流入させ、抗原抗体反応を行った。その後、リン酸バッファーをマイクロチャンネル流入部を通じて送液し、未反応残さの分離（B/F 分離）を行った。検出には熱レンズ顕微鏡を用いた。

【0020】実験では、深さ 100 μm、幅 200 μm のマイクロチャンネル流入部を石英ガラス基板内に作製し、FAB（Fast Atom Beam）で深さ 5 μm のさらに微細なチャンネルを加工してマイクロチャンネル分離部を形成し、また、半径約 1 mm の反応槽部を加工してマイクロチップとした。このマイクロチップでは、FAB 加工の部分だけチャンネル深さが浅く、反応固槽として用いるビーズをせき止められる構造を意図したものである。

【0021】なお、このマイクロチップにおいては多層構造は採用していない。反応を行う、B/F 分離等の条件を最適化するための実験をパルク量で行った。次に最適化した条件下でチャンネル内に堰き止め構造の反応槽部分に微粒子を導入しておき、PBS バッファーを送液してそのまま B/F 分離した。その後、この微粒子上に結合した標識金コロイドを熱レンズ顕微鏡で測定した。比較のため、通常用いられている方法で B/F 分離した微粒子を同じチップ内に導入して同様に測定した。その

結果、s l g A 濃度に対して信号強度に対する検量曲線が得られ、マイクロチャンネル内で B/F 分離を行ったビーズと、通常法で B/F 分離を行ったビーズとでは差異がみられないことを確認した。以上より、マイクロチャンネルの微小空調を利用した免疫分析が可能であることを示した。

（実施例2）実施例1において、ヒト s l g A をマイクロチャンネル流入部より反応槽部に導入し、これをガラス微粒子に吸着させ、次いで同様に反応を行わせ、熱レンズ顕微鏡により分析した。

【0022】その結果、通常のパルク量の分析に比べてはるかに微量の試料で短時間で、同様の B/F 分離が可能であることを確認した。

#### 【0023】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の説明によって、従来技術の限界を超えて、実際にマイクロチップ内における抗原-抗体反応を可能として免疫分析を実施することができる。そして、このような新しいマイクロチップと新しい分析方法によって、反応、分離検出を簡単な手段によって短時間で高精度で行い、しかも試料にダメージを与えることもない分析が実現される。

#### 【図面の簡単な説明】

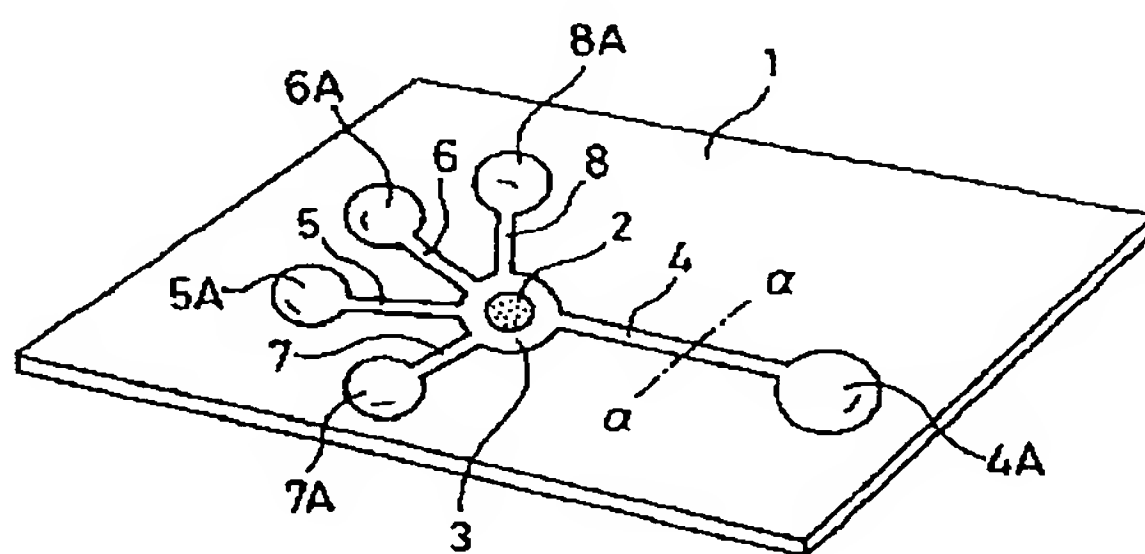
【図1】この発明のマイクロチップを例示した斜視図である。

【図2】多層構造のものを例示した断面図である。

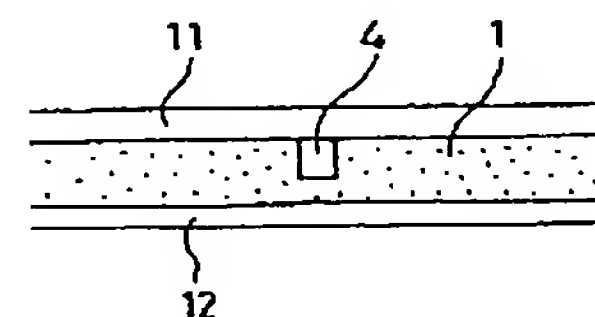
#### 【符号の説明】

- 1 基板
- 2 固体微粒子
- 3 マイクロチャンネル反応槽部
- 4 マイクロチャンネル分離部
- 4A 廃液部
- 5, 6, 7, 8 マイクロチャンネル流入部
- 5A, 6A, 7A, 8A 注入穴部
- 11 保護プレート
- 12 支持プレート

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 佐藤 記一  
東京都板橋区中台 3-27-G-2103

Fターム(参考) 2G045 AA40 FA16 FB03 FB07 FB12  
FB13

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**